

2004-00077A
1803E

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 4 年 3 月 3 1 日
Date of Application:

出 願 番 号 特 願 2 0 0 4 - 1 0 5 1 8 7
Application Number:
[ST. 10/C]: [J P 2 0 0 4 - 1 0 5 1 8 7]

出 願 人
Applicant(s): 磯部 信一郎
 又賀 駿太郎
 竹中 繁織

BEST AVAILABLE COPY

CERTIFIED COPY OF
PRIORITY DOCUMENT

2 0 0 4 年 4 月 2 6 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今 井 康 夫

出証番号 出証特 2 0 0 4 - 3 0 3 6 1 2 5

【書類名】 特許願
【整理番号】 193953
【提出日】 平成16年 3月31日
【あて先】 特許庁長官殿
【国際特許分類】 C12Q 1/68
C12N 15/09
C07K 1/13

【発明者】
【住所又は居所】 福岡県福岡市南区屋形原 1 丁目 1 9 - 2 8 - 1 2
【氏名】 磯部 信一郎

【特許出願人】
【識別番号】 503474098
【住所又は居所】 福岡県福岡市南区屋形原 1 丁目 1 9 - 2 8 - 1 2
【氏名又は名称】 磯部 信一郎

【特許出願人】
【識別番号】 501415556
【住所又は居所】 福岡県大野城市大池 2 丁目 1 7 番 5 号
【氏名又は名称】 又賀 駿太郎

【特許出願人】
【識別番号】 399045950
【住所又は居所】 福岡県古賀市舞の里 4 - 2 3 - 2 1
【氏名又は名称】 竹中 繁織

【代理人】
【識別番号】 100086405
【弁理士】
【氏名又は名称】 河宮 治
【電話番号】 06-6949-1261
【ファクシミリ番号】 06-6949-0361

【選任した代理人】
【識別番号】 100091465
【弁理士】
【氏名又は名称】 石井 久夫
【電話番号】 06-6949-1261
【ファクシミリ番号】 06-6949-0361

【先の出願に基づく優先権主張】
【出願番号】 特願2003-427268
【出願日】 平成15年12月24日

【手数料の表示】
【予納台帳番号】 163028
【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】
【物件名】 特許請求の範囲 1
【物件名】 明細書 1
【物件名】 図面 1
【物件名】 要約書 1

【書類名】特許請求の範囲

【請求項 1】

生体分子試料と有機EL色素とを反応させ、該有機EL色素で標識された該生体分子試料の蛍光を測定する生体分子の検出方法。

【請求項 2】

上記有機EL色素が、共役系を有する 5 員環化合物を含む化合物であって、該 5 員環化合物は 1 種以上のヘテロ原子、セレン原子又はボロン原子を含む請求項 1 記載の検出方法。

【請求項 3】

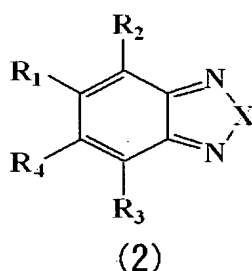
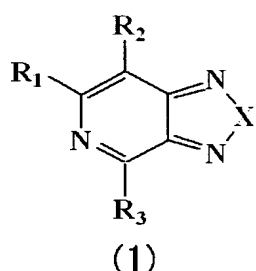
上記有機EL色素が、上記 5 員環化合物と共役系を有する 6 員環化合物とから成る縮合多環化合物である請求項 1 記載の検出方法。

【請求項 4】

上記 5 員環化合物が、アゾール誘導体又はイミダゾール誘導体である請求項 2 又は 3 に記載の検出方法。

【請求項 5】

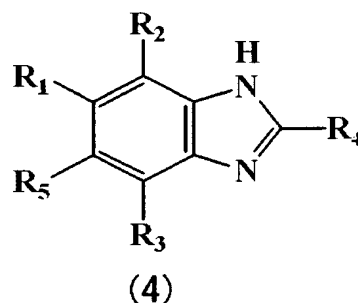
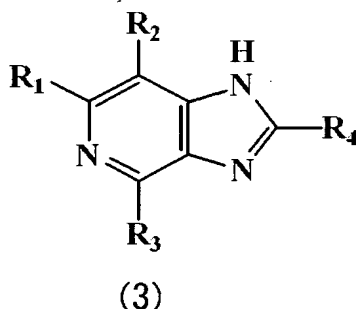
上記アゾール誘導体が、以下の一般式 (1) 又は (2) で示される化合物である請求項 4 記載の検出方法。



(式中、 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 は、それぞれ独立に、水素原子、ハロゲン原子、ヒドロキシル基、シアノ基、あるいはスルホニル基などの置換基を有してもよい芳香族炭化水素基又は炭化水素基又は複素環基又はヘテロ原子を環内に含む芳香族基を示し、 X は置換基を有してもよい窒素原子又は硫黄原子又は酸素原子又はセレン原子を示す。)

【請求項 6】

上記イミダゾール誘導体が、以下の一般式 (3) 又は (4) で表される化合物である請求項 4 記載の検出方法。



(式中、 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_5 は、それぞれ、水素原子、ハロゲン原子、ヒドロキシル基、シアノ基、あるいはスルホニル基などの置換基を有してもよい芳香族炭化水素基又は炭化水素基又は複素環基又はヘテロ原子を環内に含む芳香族基を示し、 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_5 は同じでも異なってもよい。)

【請求項 7】

上記生体分子と反応させるに先立って、上記有機EL色素に、イソシアネート基、エポキシ基、ハロゲン化アルキル基、トリアジン基、カルボジイミド基そして活性エステル化したカルボニル基から選択されたいずれか 1 種の反応性基を導入する請求項 1 から 6 のいづ

れか一つに記載の検出方法。

【請求項 8】

蛍光測定による生体分子の検出に用いる標識色素であって、生体分子と結合する反応性基を有する有機EL色素から成る標識色素。

【請求項 9】

上記反応性基が、カルボン酸基、イソシアネート基、エポキシ基、ハロゲン化アルキル基、トリアジン基、カルボジイミド基そして活性エステル化したカルボニル基から選択されたいずれか 1 種である請求項 8 記載の標識色素。

【請求項 10】

上記有機EL色素が、共役系を有する 5 員環化合物を含む化合物であって、該 5 員環化合物は 1 種以上のヘテロ原子、セレン原子又はボロン原子を含む請求項 8 又は 9 に記載の標識色素。

【請求項 11】

上記有機EL色素が、上記 5 員環化合物と共役系を有する 6 員環化合物とから成る縮合多環化合物である請求項 10 記載の標識色素。

【請求項 12】

生体分子を標識する有機EL色素を含む生体分子用標識キット。

【請求項 13】

上記有機EL色素が、カルボン酸基、イソシアネート基、エポキシ基、ハロゲン化アルキル基、トリアジン基、カルボジイミド基、そして活性エステル化したカルボニル基から選択されたいずれか 1 種の反応性基を有する請求項 12 記載の標識キット。

【請求項 14】

上記有機EL色素が、共役系を有する 5 員環化合物を含む化合物であって、該 5 員環化合物は 1 種以上のヘテロ原子、セレン原子又はボロン原子を含む請求項 12 又は 13 に記載の標識キット。

【請求項 15】

上記有機EL色素が、上記 5 員環化合物と共役系を有する 6 員環化合物とから成る縮合多環化合物である請求項 14 記載の標識キット。

【書類名】明細書**【発明の名称】** 生体分子の検出方法及びそれに用いる標識色素並びに標識キット**【技術分野】****【0001】**

本発明は、蛍光色素を用いる、核酸、タンパク質、ペプチド類、そして糖類等の生体分子の検出方法及びその検出方法に用いる標識色素並びに標識キットに関する。

【背景技術】**【0002】**

現在、世界的に特定遺伝子解析技術、遺伝子治療、テーラーメイド医療を目的としたポストゲノム研究が盛んに行われている。遺伝子解析技術としては、例えば、DNAマイクロアレイを用いたDNAの検出方法が用いられている。この検出方法によれば、多種類の遺伝子発現、機能性、変異等の同時解析を簡便かつ迅速に行うことができる。

DNAマイクロアレイを用いた検出方法は、多数のDNA又はオリゴヌクレオチドの配列（プローブ核酸）を、ガラス又はシリコン等の基板上にスポット固定したDNAチップを用いる。基板上に固定したプローブ核酸と、標識した試料RNA（標的核酸）とのハイブリダイゼーションによりプローブ核酸と相補的な塩基配列を有する標的核酸が選択的にプローブ核酸と結合する。そしてマイクロアレイを乾燥後、標識された標的核酸の蛍光強度を測定する。

標識には、蛍光色素が広く使用されており、高い蛍光強度を有すること、乾燥状態（固体状態）でも発光すること、そして水溶性を有することなどが要求されている。蛍光色素としては、例えば、Cy3やCy5が使用されている（非特許文献1）。

【非特許文献1】 Science 283, 1, January, 1999, 83-87

【発明の開示】**【発明が解決しようとする課題】****【0003】**

しかしながら、Cy3やCy5は、高い蛍光強度を有し、固体状態でも発光する利点を有するが、非常に高価であるため、検出方法が高コストにならざるを得ない。また、試料RNA中への取り込み率が低く、試料RNAに対して十分な標識ができないため検出感度が十分でないという問題もある。これに対し、Cy3やCy5に代わる蛍光色素が見出されていないのが現状である。

そこで、本発明は、上記課題を解決し、より低コストで高感度の生体分子の検出方法を提供することを目的とした。

【課題を解決するための手段】**【0004】**

本発明者は、Cy3やCy5に代わる蛍光色素を探索する過程において、有機EL素子に使用されている有機EL色素が、生体分子の標識として用いた場合、高い蛍光強度を有することを見出して本発明を完成させたものである。

すなわち、本発明の生体分子の検出方法は、生体分子試料と有機EL色素とを反応させ、該有機EL色素で標識された該生体分子試料の蛍光を測定することの特徴とする。

【0005】

ここで、本発明において生体分子とは、生体中に存在する分子種を意味し、生体の構造を構築するためのもの、エネルギーの生産・変換に関与するもの、そして生体情報をつかさどるものが含まれる。具体的には、核酸、タンパク質、糖類、脂質、ペプチド類、ヌクレオチド、代謝中間体や代謝酵素系、ホルモン、そして神経伝達物質等が含まれる。

【0006】

また、上記有機EL色素には、共役系を有する5員環化合物を含む化合物であって、その5員環化合物が1種以上のヘテロ原子、セレン原子又はボロン原子を含む化合物を用いることができる。さらに、その5員環化合物と共役系を有する6員環化合物とから成る縮合多環化合物を用いることもできる。さらに、その5員環化合物には、アゾール誘導体又はイミダゾール誘導体を用いることができる。

【0007】

また、上記生体分子試料には、核酸、タンパク質、ペプチド類、そして糖類からなる群から選択されたいずれか1種を用いることができる。

【0008】

また、上記生体分子と反応させるに先立って、有機EL色素に、イソシアネート基、エポキシ基、ハロゲン化アルキル基、トリアジン基、カルボジイミド基そして活性エステル化したカルボニル基から選択されたいずれか1種の官能基を導入することができる。

【0009】

また、本発明の標識色素は、蛍光測定による生体分子の検出に用いる標識色素であって、生体分子と結合する反応性基を有する有機EL色素から成ることを特徴とする。その反応性基としては、カルボン酸基、イソシアネート基、エポキシ基、ハロゲン化アルキル基、トリアジン基、カルボジイミド基そして活性エステル化したカルボニル基から選択されたいずれか1種の官能基を用いることができる。また、有機EL色素には、共役系を有する5員環化合物を含む化合物であって、その5員環化合物が1種以上のヘテロ原子、セレン原子又はボロン原子を含む化合物を用いることができる。さらに、その5員環化合物と共役系を有する6員環化合物とから成る縮合多環化合物を用いることもできる。さらに、その5員環化合物には、アゾール誘導体又はイミダゾール誘導体を用いることができる。

【0010】

また、本発明の生体分子用標識キットは、生体分子を標識する有機EL色素を含むことを特徴とする。生体分子には、核酸、タンパク質、ペプチド類、そして糖類からなる群から選択されたいずれか1種を用いることができる。その反応性基としては、カルボン酸基、イソシアネート基、エポキシ基、ハロゲン化アルキル基、トリアジン基、カルボジイミド基そして活性エステル化したカルボニル基から選択されたいずれか1種の官能基を用いることができる。また、有機EL色素には、共役系を有する5員環化合物を含む化合物であって、その5員環化合物が1種以上のヘテロ原子、セレン原子又はボロン原子を含む化合物を用いることができる。さらに、その5員環化合物と共役系を有する6員環化合物とから成る縮合多環化合物を用いることもできる。さらに、その5員環化合物には、アゾール誘導体又はイミダゾール誘導体を用いることができる。

【0011】

例えば、DNAマイクロアレイのキットとして用いる場合、生体分子試料に核酸を用い、プローブ核酸をマイクロアレイに固定する一方、試料である標的核酸を有機EL色素と反応させて標識し、その標識された標的核酸をマイクロアレイにスポットしてハイブリダイゼーションを行うこともできる。また、アビジン（ストレプトアビジン）-ビオチン間の結合を応用し、この色素で修飾したアビジンを用いてELISA（酵素免疫測定法）やウェスタン・ブロットなどの生物学的アッセイキットとして用いることもできる。また、タンパクアレイのキットとして用いることもできる。また、糖、タンパクなどの生体分子を効率よく標識できることから、細胞を染色することも可能である。

【発明の効果】

【0012】

本発明によれば、生体分子の標識色素として有機EL色素を用いることにより、以下ののような効果が得られる。

すなわち、有機EL色素は固体状態（固体及び半固体を含む）で高い量子収率を有しており高い蛍光強度を有している。さらに、有機EL色素はCy3やCy5に比べ安価であるので、より低コストで生体分子の検出を行うことができる。また、有機EL色素は生体分子とほぼ定量的に反応し、高い取り込み率を有しているため、高い検出感度を得ることができる。また、蛍光波長の選択の自由度が増加し、オレンジ、イエロー、グリーン、ブルーなど多くの蛍光波長を用いることができる。これにより、ストークスシフトの大きい（励起波長と蛍光波長の差が大きい）2種以上の蛍光色素を用いることが可能となるので、一つの試料中に含まれる複数の標的核酸を同時に検出することも可能となる。また、Cy3やCy5は冷凍保存する必要があるのに対し、有機EL色素は化学的に安定であり、常温での長期保存に耐

えることができるので、取り扱いが容易である。

【発明を実施するための最良の形態】

【0013】

以下、本発明の実施の形態について詳細に説明する。

本発明に用いる有機EL色素は、一对の陽極と陰極との間に固体状態で挟持され、陽極から注入された正孔と陰極から注入された電子とが再結合する際のエネルギーにより発光可能な色素であれば特に限定されない。例えば、テトラフェニルブタジエンやペリレン等の多環芳香族化合物、シクロペンタジエン誘導体、ジスチリルピラジン誘導体、アクリドン誘導体、キナクドリン誘導体、スチルベン誘導体、フェノチアジン誘導体、ピラジノピリジン誘導体、アゾール誘導体、イミダゾール誘導体、カルバゾール誘導体そしてテトラフェニルチオフェン誘導体等を用いることができる。さらに、分子内にカルボン酸基を有し、又はカルボン酸基を導入可能な色素であることが好ましい。以下に述べるように、生体分子と結合するための反応性基の導入を容易に行うことができるからである。

【0014】

有機EL色素は、生体分子試料（以下、標的分子という）と結合するための反応性基を有することが好ましく、その反応性基には、標的分子のアミノ基、イミノ基、チオール基又はヒドロキシル基と反応可能な官能基を有するものが好ましい。その官能基には、例えば、イソチオシアネート基、イソシアネート基、エポキシ基、ハロゲン化スルホニル基、塩化アシル基、ハロゲン化アルキル基、グリオキザル基、アルデヒド基、トリアジン基、カルボジイミド基そして活性エステル化したカルボニル基等を用いることができる。イソシアネート基、エポキシ基、ハロゲン化アルキル基、トリアジン基、カルボジイミド基そして活性エステル化したカルボニル基から選択されたいずれか1種を用いることが好ましい。さらに好ましくはトリアジン基、カルボジイミド基又は活性エステル化したカルボニル基である。標的分子のアミノ基とアミド結合を形成することができ、また生体分子内のイミノ基に直接結合する事ができるからである。また、これらの有機EL色素がカルボン酸基を有する場合、カルボジイミド誘導体、トリアジン誘導体の存在下で、生体分子中に存在するアミノ基およびイミノ基を直接修飾する事も可能である。更に、置換基を有しても良いトリアジン基、置換基を有しても良いカルボジイミド基を有する有機EL色素は、DNA塩基中のグアニン、チミンのイミノ基と直接反応するため、PCR法による色素の導入を行う必要が無く、ミスマッチ検出などへの応用が可能である。

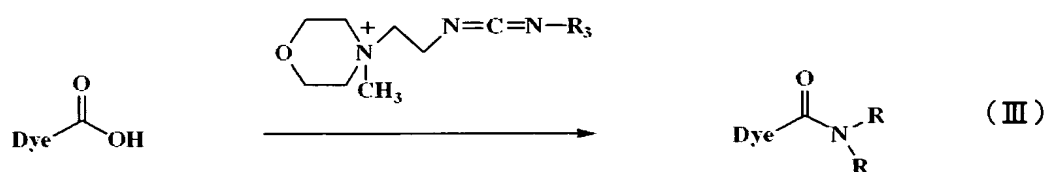
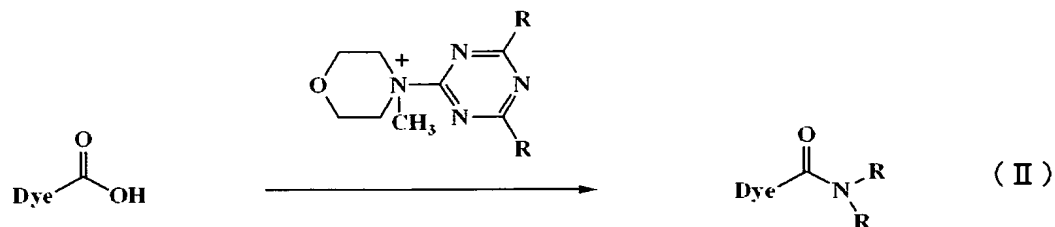
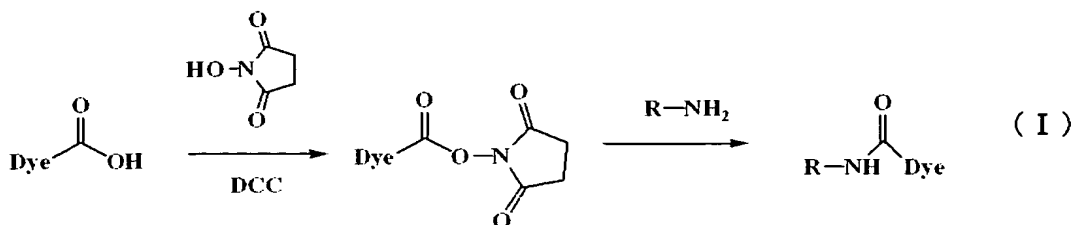
【0015】

例えば、活性エステル化したカルボニル基には、N-ヒドロキシースクシンイミドエステルやマレイミドエステルを用いることができる。N-ヒドロキシースクシンイミドを用いることにより、以下のスキーム1の式Iに示すように、縮合剤としてDCCを用いることによりN-ヒドロキシースクシンイミドエステル体を経由してアミド結合によりEL色素と標的分子が結合する。また、スキーム1の式IIに示すように、活性エステル化したカルボニル基には、トリアジン誘導体を用いることもできる。また、カルボジイミド基には、N,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド（DCC）や1-シクロヘキシル-3-(2-モルホリノエチル)カルボジイミド等のカルボジイミド試薬を用いることができる。カルボジイミド体を経由してアミド結合によりEL色素と標的分子を結合させることができる（式III）。また、分子内に直接カルボジイミド基、トリアジン基を有するEL色素は、生体分子内のアミノ基、イミノ基に対して直接結合させる事もできる（式IV）。

さらに、有機EL色素の置換基を変えることにより、励起波長及び発光波長を変化させることができるので、多色化により多種類の試料の同時検出を行うこともできる。

【0016】

【化1】



スキーム 1.

なお、標的分子がDNAの場合にはオリゴDNA末端に修飾されたアミノ残基と、タンパク質の場合にはアミノ残基と、ペプチド類の場合にはポリペプチドのアミノ基と、例えばポリリシン誘導体のアミノ残基と、そして糖類の場合には多糖類誘導体骨格内のアミノ基と反応性基を結合させることができる。

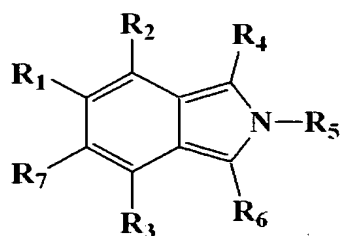
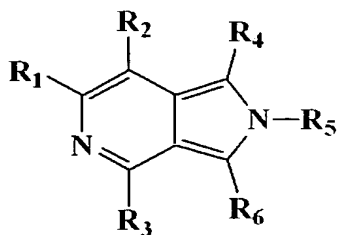
【0017】

本発明の検出方法に用いる好ましい有機EL色素は、共役系を有する5員環化合物を含む化合物であって、その5員環化合物が1種以上のヘテロ原子、セレン原子又はボロン原子を含むものを挙げることができる。さらに、詳しくは共役系を有する5員環化合物から成る単環化合物と、その5員環化合物と共役系を有する6員環化合物から成る縮合多環化合物を挙げることができる。固体状態であっても、量子収率が大きく、強い蛍光を示すからである。

【0018】

以下に、縮合多環化合物の具体例について説明する。
(モノアゾール誘導体1)

【化2】

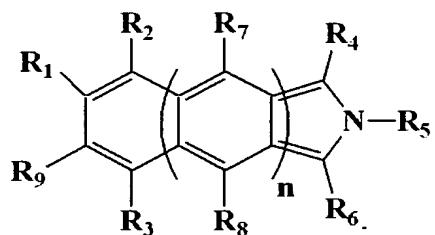
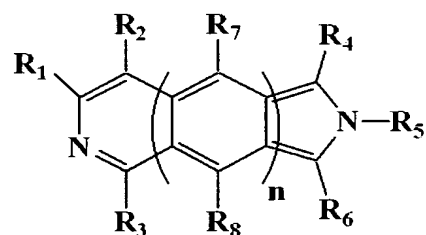


ここで、式中、 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_6 、 R_7 は、それぞれ独立に、水素原子、ハロゲン原子、ヒドロキシル基、シアノ基、あるいはスルホニル基などの置換基を有しても良い芳香族炭化水素基又は炭化水素基又は複素環基又はヘテロ原子を環内に含む芳香族基を示す。 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_6 、 R_7 は同じでも異なってもよい。なお、以下の一般式においても、特に断らない限り同様である。

【0019】

(モノアゾール誘導体2)

【化3】

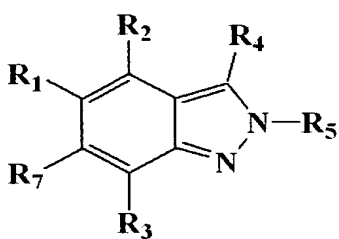
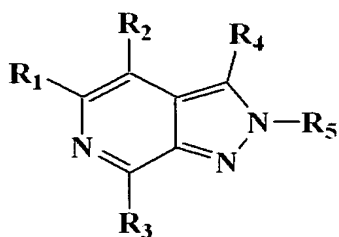


ここで、式中、 R_8 、 R_9 は、それぞれ、水素原子、ハロゲン原子、ヒドロキシル基、シアノ基、スルホニル基などの置換基を有しても良い芳香族炭化水素基又は炭化水素基又は複素環基又はヘテロ原子を環内に含む芳香族基を示す。 R_8 、 R_9 は同じでも異なってもよい。なお、以下の一般式においても、特に断らない限り同様である。また、 n は1以上の整数、好ましくは1～5であり、以下の一般式中でも同様である。

【0020】

(ジアゾール誘導体1)

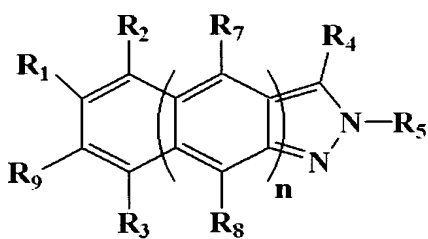
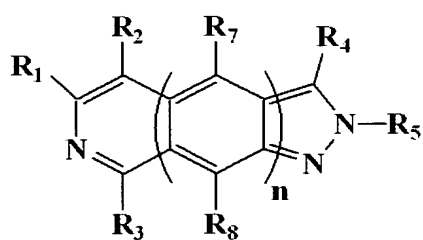
【化4】



【0021】

(ジアゾール誘導体2)

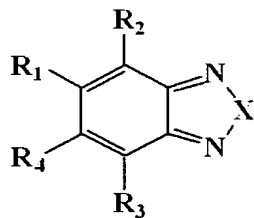
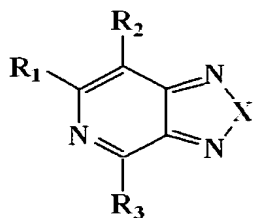
【化5】



【0022】

(ジアゾール誘導体3)

【化6】



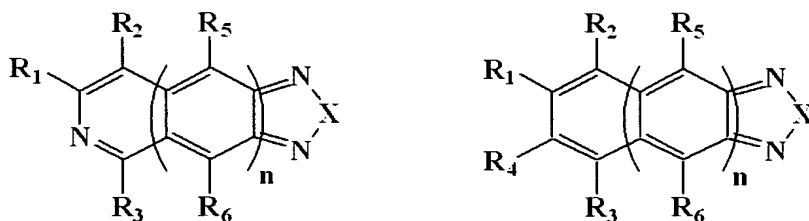
ここで、式中、 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 は、それぞれ独立に、水素原子、ハロゲン原子、ヒドロキシル基、シアノ基、あるいはスルホニル基などの置換基を有しても良い芳香族炭化水素基又は炭化水素基又は複素環基又はヘテロ原子を環内に含む芳香族基を示す。 R_1 、 R

2、 R_3 、 R_4 、 R_6 、 R_7 は同じでも異なってもよい。 R_2 、 R_3 は、置換基を有しても良い芳香族炭化水素基を用いることが好ましく、その置換基には炭素数1から4のアルキル基やアルコキシ基、又は臭素原子を用いることが好ましい。さらに、アルキル基にはメチル基、アルコキシ基にはメトキシ基を用いることが好ましい。また、 X は、置換基を有しても良い窒素原子、硫黄原子、酸素原子、セレン原子又はボロン原子であり、特に断らない限り以下の一般式中でも同様である。

【0023】

(ジアゾール誘導体4)

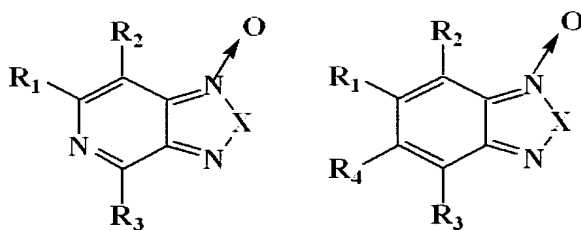
【化7】



【0024】

(ジアゾール誘導体5)

【化8】

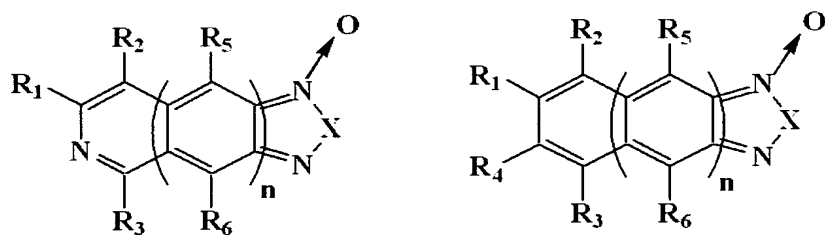


ここで、 $N \rightarrow O$ は、窒素原子が酸素原子に配位結合している状態を示す。

【0025】

(ジアゾール誘導体6)

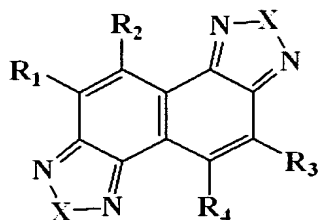
【化9】



【0026】

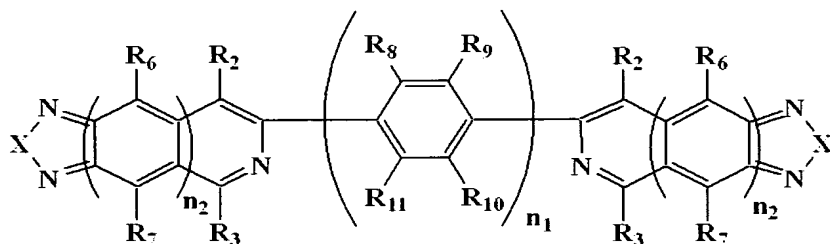
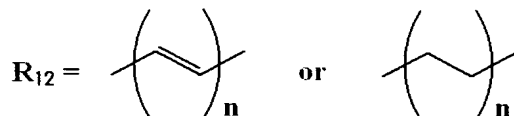
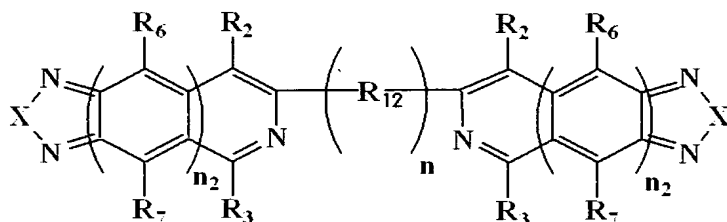
(ジアゾール誘導体7)

【化10】



【0027】

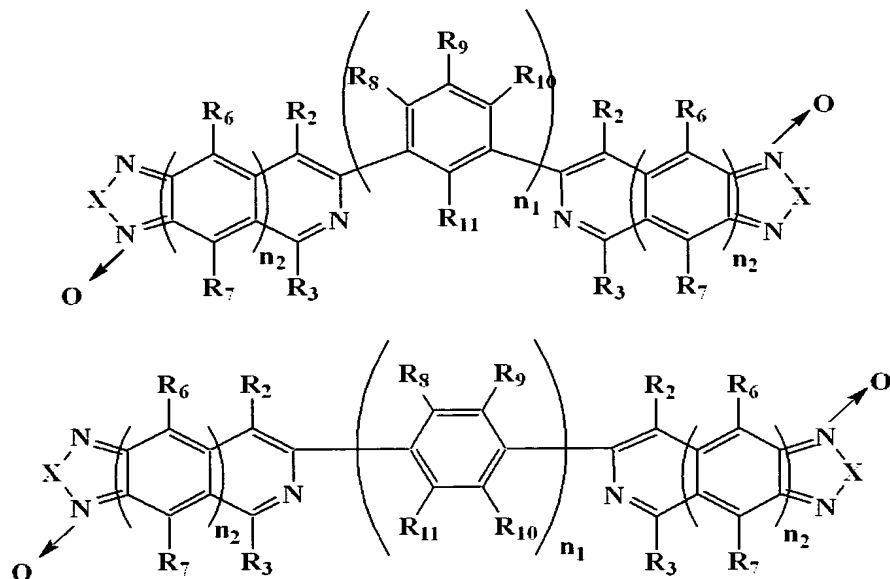
(ジアゾール誘導体8)


$$\text{X} \begin{array}{c} \diagup \text{N} \\ \diagdown \text{N} \end{array} \begin{array}{c} \text{R}_6 \\ \text{R}_2 \\ \text{R}_7 \\ \text{R}_3 \end{array} \text{N} \text{---} \left(\text{R}_{12} \right)_n \text{---} \begin{array}{c} \text{R}_2 \\ \text{R}_6 \\ \text{R}_3 \\ \text{R}_7 \end{array} \begin{array}{c} \text{N} \\ \text{N} \end{array} \text{X}$$


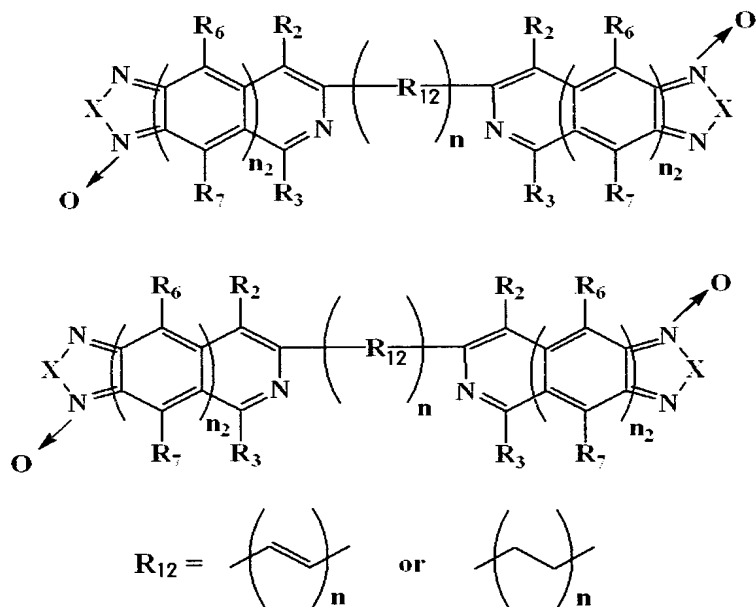
【 0 0 2 8 】

出証特 2 0 0 4 - 3 0 3 6 1 2 5

【化12-1】



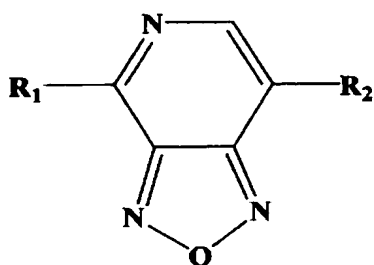
【化12-2】



【0029】

上記のジアゾール誘導体ではあれば特に限定されないが、以下の一般式で表されるオキサジアゾロピリジン誘導体を好適に用いることができる。

【化13】

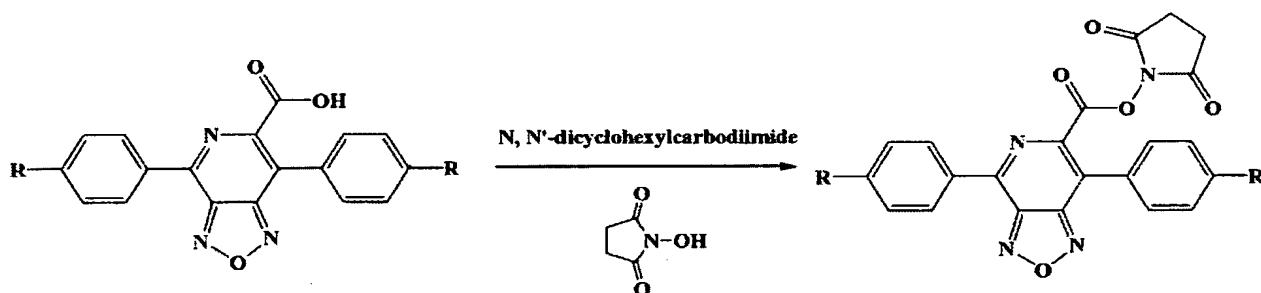


【0030】

オキサゾロピリジン誘導体は、そのカルボン酸誘導体を合成後、例えば、以下のスキーム2に示す反応により、N,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド (DCC) を縮合剤として用い、N-ヒドロキシスクシンイミドエステルを含む活性エステル体へ誘導したものをを用いることができる。

【0031】

【化14】

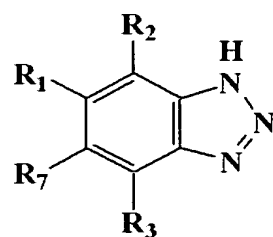
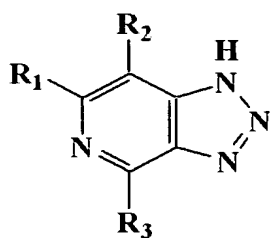


スキーム2.

【0032】

(トリアゾール誘導体1)

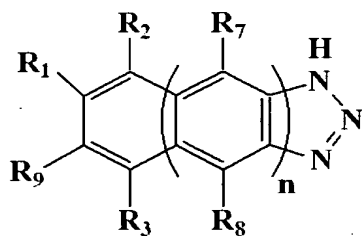
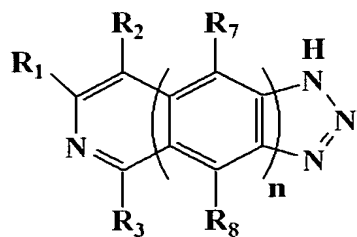
【化15】



【0033】

(トリアゾール誘導体2)

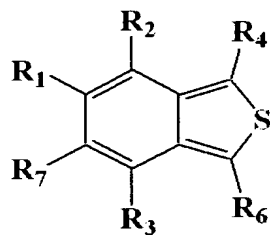
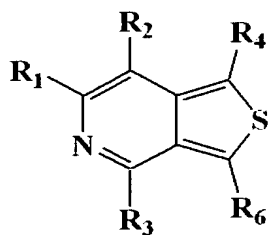
【化16】



【0034】

5員環化合物として、チオフエン基を含む以下の誘導体を用いることもできる。
(チオフエン誘導体1)

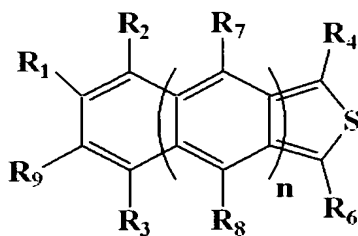
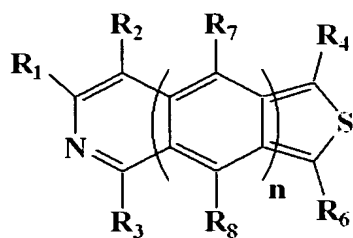
【化17】



【0035】

(チオフエン誘導体2)

【化18】

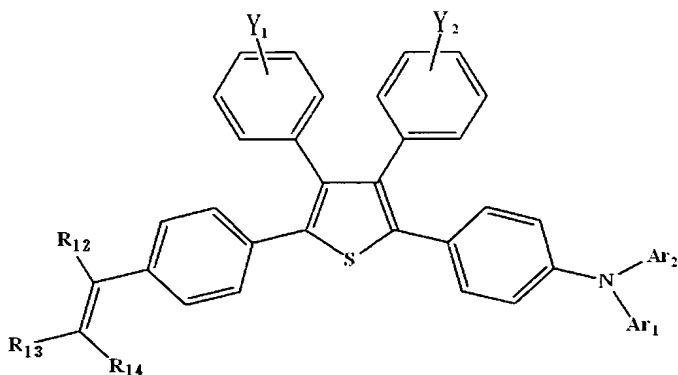


【0036】

(チオフエン誘導体3)

また、チオフエン誘導体の場合、非縮合系の化合物であり、以下の一般式で示される2,3,4,5-テトラフェニルチオフエン誘導体を用いることもできる。

【化19】



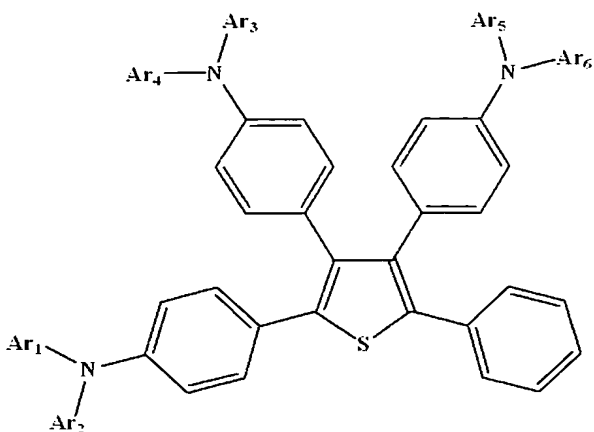
ここで、式中、 R_{12} , R_{13} , R_{14} はそれぞれ独立に、水素原子、直鎖、分岐または環状のアルキル基、置換または未置換のアリール基、あるいは置換または未置換のアラルキル基を表し、 Ar_1 および Ar_2 は置換または未置換のアリール基を表し、さらに、 Ar_1 と Ar_2 は結合している窒素原子と共に含窒素複素環を形成してもよい。また、 Y_1 および Y_2 は水素原子、ハロゲン原子、直鎖、分岐または環状のアルキル基、直鎖、分岐または環状のアルコキシ基、置換または未置換のアリール基、置換または未置換のアラルキル基、あるいは置換または未置換のアミノ基を表す。

【0037】

(チオフエン誘導体4)

また、以下の一般式で示される2,3,4,5-テトラフェニルチオフエン誘導体を用いることもできる。

【化 20】



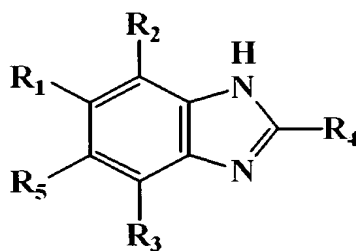
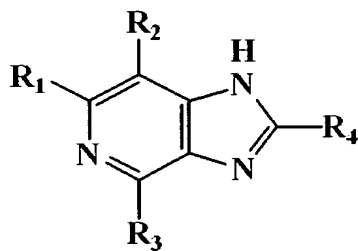
ここで、式中、Ar₁～Ar₆はそれぞれ独立に、置換または未置換のアリール基を表し、さらに、Ar₁とAr₂、Ar₃とAr₄およびAr₅とAr₆は結合している窒素原子と共に含窒素複素環を形成していても良い。

【0038】

また、5員環化合物にイミダゾールを用い、以下の一般式で示すイミダゾール誘導体を用いることもできる。

(イミダゾール誘導体1)

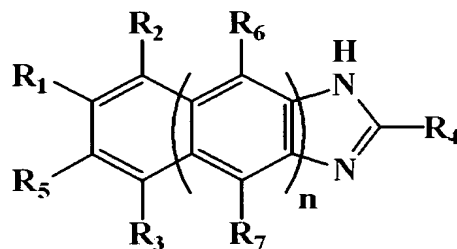
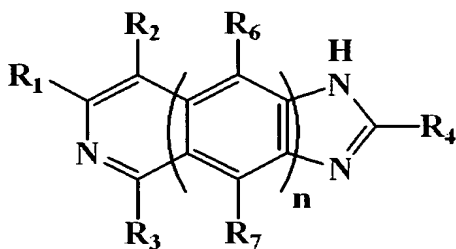
【化 21】



【0039】

(イミダゾール誘導体2)

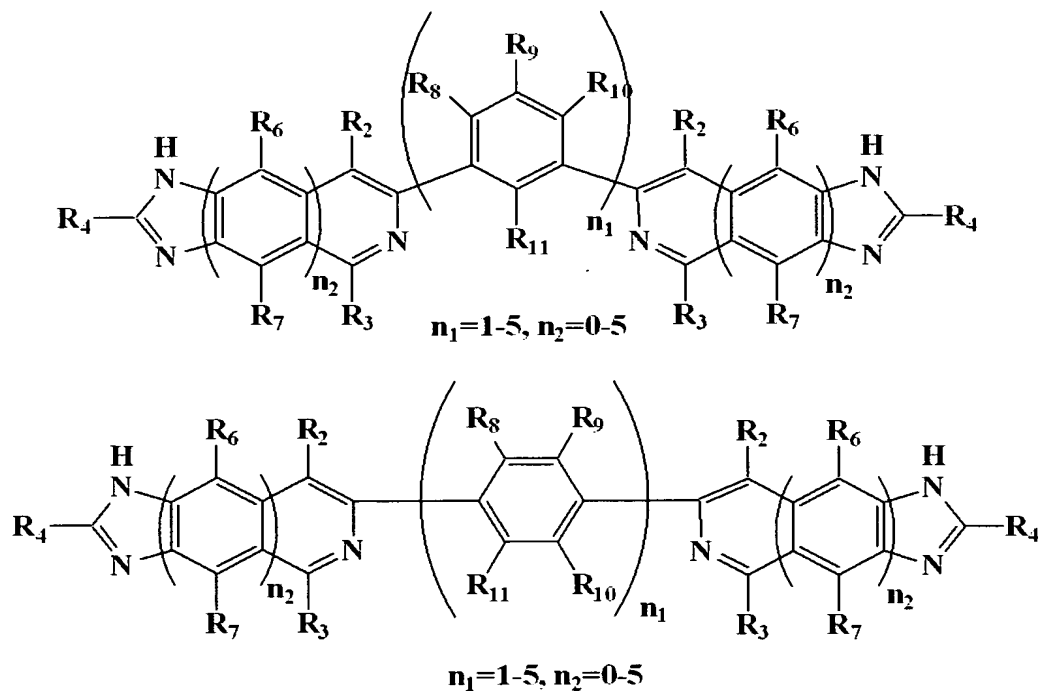
【化 22】



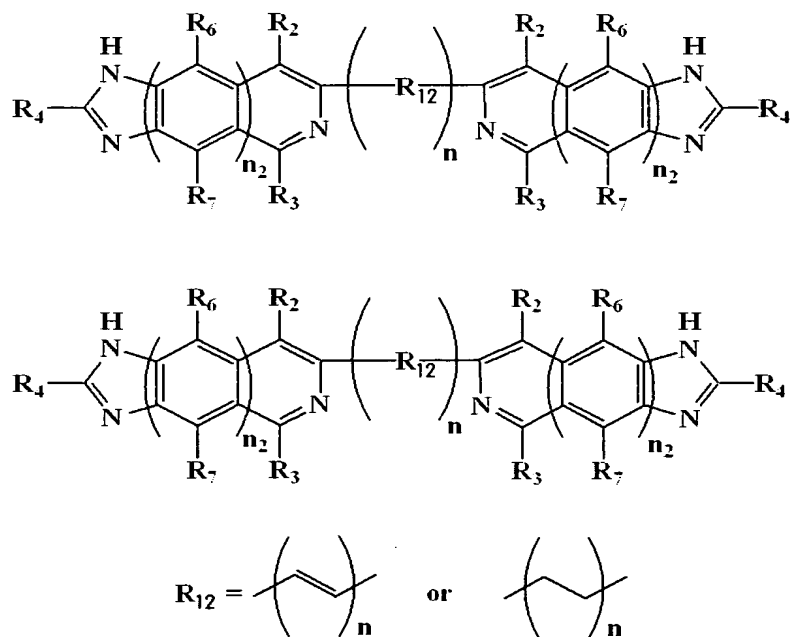
【0040】

(イミダゾール誘導体3)

【化 23-1】



【化 23-2】



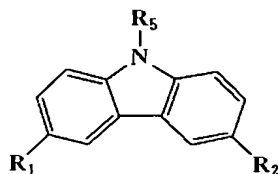
ここで、イミダゾール骨格は中央のベンゼン環 R_8, R_9, R_{10}, R_{11} の任意の位置に複数ユニットが結合していても良い。また、 R_{12} は、置換基を有してもよいオレフィン基又はパラフィン基であり、 n は1から3の整数、好ましくは1である。

【0041】

(カルバゾール誘導体)

また、以下の一般式で示されるカルバゾール誘導体を用いることもできる。

【化24】

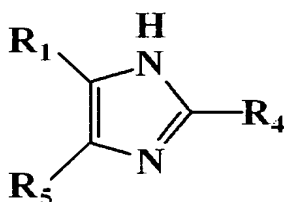


【0042】

また、共役系を有する5員環化合物であって、1種以上のヘテロ原子、セレン原子又はボロン原子を含む単環化合物を用いることもできる。特に限定されないが、例えば、以下の一般式で表されるアゾール誘導体を用いることができる。

【0043】

【化25】



ここで、式中、 R_1 、 R_4 、 R_5 は、それぞれ独立に、水素原子、ハロゲン原子、ヒドロキシ基、シアノ基、あるいはスルホニル基などの置換基を有しても良い芳香族炭化水素基又は炭化水素基又は複素環基又はヘテロ原子を環内に含む芳香族基を示す。 R_1 、 R_4 、 R_5 は同じでも異なってもよい。

【0044】

本発明の検出方法は、標識された固体あるいは半固体状態の生体分子の蛍光を測定する検出方法であれば、あらゆる検出方法に適用することができる。例えば、DNAマイクロアレイを用いる遺伝子解析に用いる場合、以下の手順で行うことができる。

基板に固定するプローブ核酸には、遺伝子の発現を調べる場合、cDNA等をcDNAのライブラリー、ゲノムのライブラリー又は全ゲノムをテンプレートとしてPCR法により増幅して調製したものをを用いることができる。また、遺伝子の変異等を調べる場合、標準となる既知の配列をもとにして、変異等に対応する種々のオリゴヌクレオチドを合成したものをを用いることができる。

【0045】

プローブ核酸の基板上への固定は、核酸の種類や基板の種類に応じて適当な方法を選択することができる。例えば、DNAの荷電を利用し、ポリリシン等の陽イオンで表面処理した基板に静電結合させる方法を用いることもできる。

【0046】

一方、標的核酸と有機EL色素を混合して反応させることにより、有機EL色素により標識された標的核酸を調製する。反応温度は室温～60℃、反応時間は2～48時間で行うことが好ましい。

【0047】

次いで、標識された標的核酸を基板上にスポットし、ハイブリダイゼーションを行う。ハイブリダイゼーションは、室温～70℃、そして2～48時間の範囲で行うことが好ましい。ハイブリダイゼーションにより、プローブ核酸と相補的な塩基配列を有する標的核酸が選択的にプローブ核酸と結合する。その後、基板を洗浄して、室温で乾燥する。

【0048】

次いで、乾燥した基板の表面の蛍光強度を蛍光レーザスキャナ法により測定する。蛍光強度により、遺伝子発現のレベルをモニタリングすることができる。

なお、上記のハイブリダイゼーションは、プローブ核酸を基板に固定する方法について

説明したが、予め有機EL色素で標識した標的核酸を基板に固定し、プローブ核酸を基板上にスポットする方法を用いることもできる。

【0049】

本発明の標識キットは、生体分子を標識する有機EL色素又はその誘導体を含むが、必要により色素を対象とする生体分子と反応させるための、試薬、酵素、溶媒等を含むことができる。対象とする生体分子は、核酸、タンパク質、ペプチド類、又は糖類である。また、有機EL色素は、生体分子のアミノ基と反応する官能基を有する誘導体であることが好ましく、その官能基を例示すると、イソシアネート基、エポキシ基、ハロゲン化アルキル基、トリアジン基、カルボジイミド基そして活性エステル化したカルボニル基から選択されたいずれか1種であることが好ましい。さらに好ましくは、トリアジン基、カルボジイミド体又は活性エステル化したカルボニル基を含む活性エステル体を有機EL色素の誘導体として含むことが好ましい。

【実施例】

【0050】

以下、実施例を用いてさらに詳細に本発明について説明する。

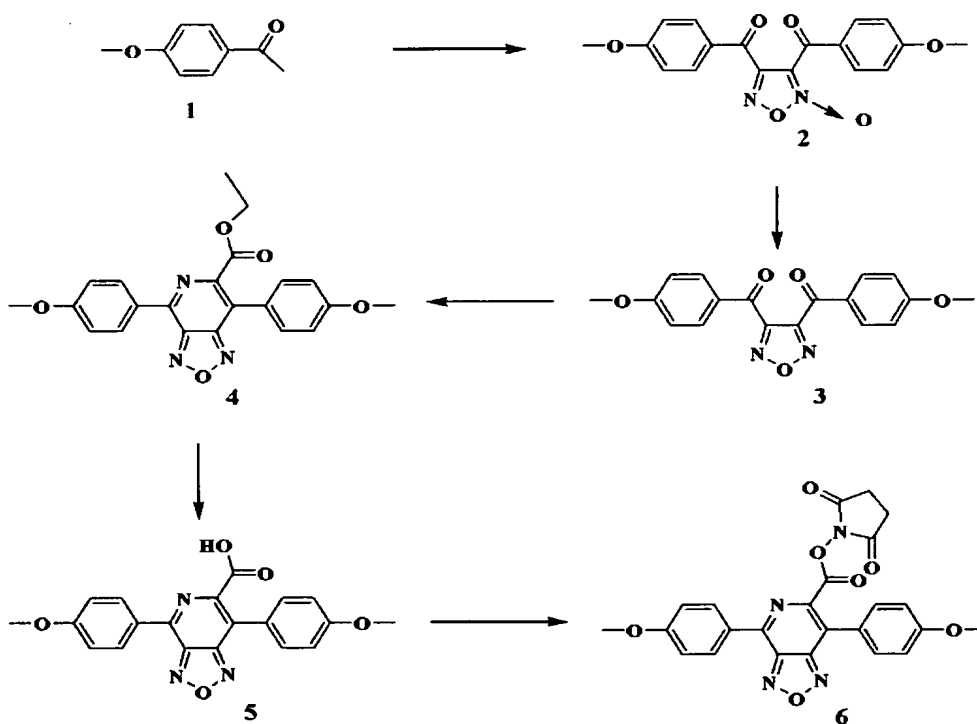
合成例 1.

有機EL色素として1, 2, 5,-オキサジアゾロ-[3, 4-c]ピリジン誘導体を用いた。

以下に、1, 2, 5,-オキサジアゾロ-[3, 4-c]ピリジンの活性エステル体（以下、EL-OSuと略す。）の合成スキームを示す。

【0051】

【化26】



スキーム 3.

【0052】

(1) ジケトン誘導体(2)の合成

500mL三口フラスコに4-メトキシアセトフェノン(1)37.5 g (0.25 mol)、亜硝酸ナトリウム0.15 gを酢酸100 mLに溶解した。水浴中、HNO₃ 100 mLを酢酸100 mLに溶解したものを2時間かけて滴下した。その後、室温で2日間攪拌した。反応混合物を500mLの水にゆっ

くりと入れ、沈殿を生成させた。沈殿物は濾過し、クロロホルムに溶解した。クロロホルム相を飽和重曹水で洗浄し、10% NaCl 水溶液で2回洗浄した。MgSO₄で脱水した後、減圧下、クロロホルムを留去し、オキサジアゾール-N-オキサイド(2)を34.5 g (収率78%)で得た。

【0053】

(2) ジケトン誘導体(3)の合成

500mL三口フラスコにオキサジアゾール-N-オキサイド(2)17.7 g (0.05 mol)をアセトニトリル400 mLに溶解した。それにZn 12.0 g、AcOH 7 mL、Ac₂O 20mLを添加した。水浴中で反応温度が30℃を超えないように冷却した。12時間攪拌して反応終点とした。反応混合物を濾過し、不溶分を除去した。アセトニトリルを減圧下留去して残渣を得た。残渣をクロロホルムで再結晶し、オキサジアゾール-N-オキサイド(3)を10.2 g (収率60%)で得た。

【0054】

(3) オキサゾロピリジンエチルエステル(4)の合成

500mL三口フラスコでオキサジアゾール-N-オキサイド(3)15.6 g (0.046 mol)をブタノール300 mLに溶解した。そこへグリシンエチルエステル塩酸塩 32.0 g (0.23 mol)を添加した。24時間加熱還流を行った。ブタノールを減圧下留去し、残渣を得た。残渣を200mLのクロロホルムに溶解し、10% HCl、飽和NaHCO₃、10%NaClで洗浄した。MgSO₄で乾燥し、溶媒を留去した。得られた残渣をクロロホルムで再結晶し、オキサジアゾロピリジンエチルエステル(4)を13.0 g (収率 70%)で得た。

【0055】

(4) オキサゾロピリジンエチルエステル(4)の加水分解

500mL三口フラスコでオキサジアゾロピリジンエチルエステル(4)3.0 g (0.007 mol)を200 mLのエタノールに溶解した。そこへKOH 0.62 g (0.01 mol)を添加した。5時間加熱還流を行った後、反応混合物を200 mLの水へ添加した。この水溶液に濃塩酸を滴下してpH 1に調整したところ沈殿が生じた。沈殿物を濾過し、クロロホルムに溶解した。クロロホルム相を10% NaHCO₃水溶液、水で洗浄した。クロロホルムを留去して残渣を得た。残渣を水-エタノール (1:1)で再結晶し、2.1 g (収率 81%)のオキサジアゾロピリジンカルボン酸(5)を得た。

【0056】

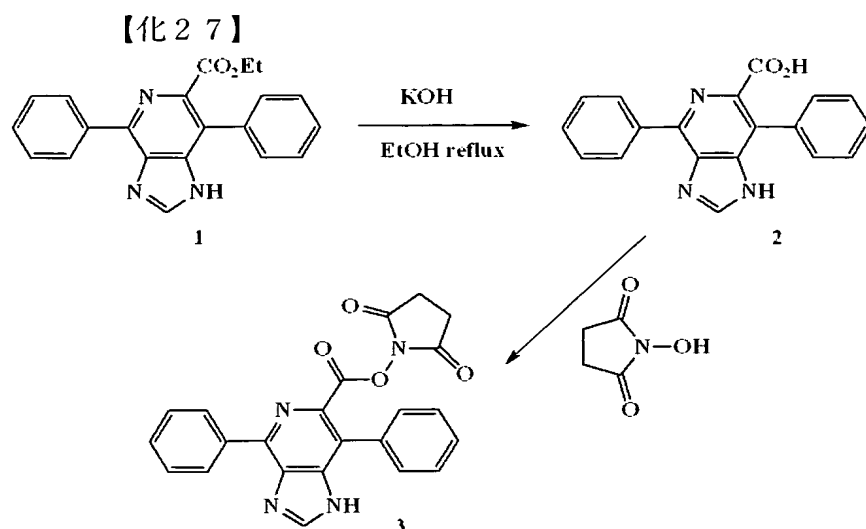
活性エステル(6)の合成

50 mL 三口フラスコでオキサジアゾロピリジンカルボン酸(5)1.0 g (0.0026 mol)とN-ヒドロキシスクシンイミド0.30 g (0.0026 mol)をDMF 20mLに溶解した。これにN, N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド 0.54 g (0.0026 mol)を30分かけて滴下した。滴下後、室温で30時間攪拌した。減圧下、DMFを留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (クロロホルム) で単離精製し、オキサジアゾロピリジン活性エステル体(6)を0.76 g (収率62%)得た。

【0057】

合成例 2.

有機EL色素としてイミダゾロピリジンエチルエステル誘導体を用いた。以下に、イミダゾロピリジンエチルエステルの活性エステル体 (以下、im-EL-OSuと略す。) の合成スキームを示す。



スキーム 4.

【0058】

(1) イミダゾピリジンエチルエステル(1)の加水分解

500mL三口フラスコでエステル体1 0.5 g (1.5 mmol)を50 mLのエタノールに溶解した。そこへKOH 0.12 g (2.1 mol)を添加した。5時間加熱環流を行った後、反応混合物を50 mLの水へ添加した。この水溶液に濃塩酸を滴下してpH 1に調整したところ沈殿が生じた。沈殿物を濾過し、クロロホルムに溶解した。クロロホルム相を10% NaHCO₃水溶液、水で洗浄した。クロロホルムを留去して残渣を得た。残渣を水で再結晶し、0.3 g (収率 63%)のカルボン酸 2 を得た。

【0059】

(2) 活性エステル(3)の合成

50 mL 三口フラスコでカルボン酸誘導体2 0.2 g (0.6 mmol)とN-ヒドロキシスクシンイミド0.07 g (0.6 mmol)をDMF 10mLに溶解した。これにN, N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド 0.12 g (0.6 mmol)を30分かけて滴下した。滴下後、室温で30時間攪拌した。減圧下、DMFを留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (クロロホルム) で単離精製し、活性エステル体3を0.14 g (収率55%)得た。

【0060】

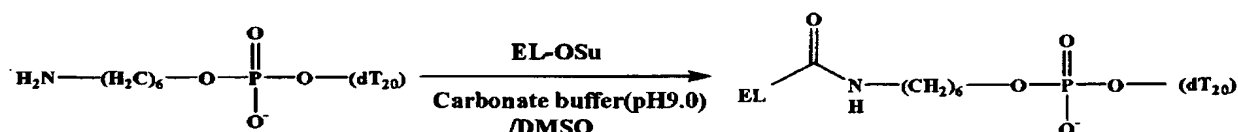
実施例 1.

〈オリゴヌクレオチドの色素標識及び検出 (1)〉

1. オリゴヌクレオチドの色素標識

オリゴヌクレオチドの色素標識は、以下のスキーム 4で行った。

【化 28】



スキーム 4.

【0061】

(実験操作)

H₂N-dT₂₀(40 mmol)を含むNa₂CO₃/NaHCO₃buffer(pH 9.0)40 μlに、有機EL色素の活性エステル5.0 μmol(2.4 mg)を含む無水 DMSO溶液12 μlを加えて室温で6時間振とうした。

振とう後、全量が1mlになるように0.1M TEAA(triethylamine-acetic acid)buffer(pH7.0)を加え、NAP-10カラム(Parmacia SephadexG-25)を用いてオリゴヌクレオチドに由来する成分を分取した。その際、NAP-10カラムはあらかじめ0.1M TEAA buffer 15mlで平衡化させた後使用した。全量が1mlになるようにメスアップした試料をカラムに充填し、1mlの溶液が溶出した後、0.1M TEAA bufferを1.5mlチャージした。この直後からの溶出液1.5mlを分取した。この得られた溶液を一晩凍結乾燥し、滅菌蒸留水20 μ lを加えて逆相HPLCにより分析した。HPLCにインジェクトした溶液は、40分の1に希釈して分析した。

【0062】

(HPLC測定条件)

カラム:Lichrospher RP-18(Cica-MERCK) 流速:1ml/min

検出波長:260nm 試料注入溶媒:超純水

溶離液A:0.1M TEAA buffer(pH7.0), 10% CH₃CN溶液

溶離液B:0.1M TEAA buffer(pH7.0), 40% CH₃CN溶液

【0063】

表1. HPLC測定のグラジエント条件

	0	30	35	40(min)
A	100	0	0	100(%)
B	0	100	100	0(%)

【0064】

標識されたオリゴヌクレオチドのHPLCスペクトルと目的物のUVスペクトルをそれぞれ図1の(a)と(b)に示す。HPLCの結果、RT=30 min付近に目的物由来のピークが得られたと判断し、HPLC分取を行った。得られた目的物の同定は、MALDI TOF MASSにより行った。その結果を図2に示す。HPLCクロマトグラムからピーク面積から反応率を算出した結果、約90%であり、ほぼ定量的にEL色素の活性エステル(6)がオリゴDNAと反応した。

【0065】

2. 標識されたオリゴヌクレオチドの検出

次に、以下の表2に示すように、標識されたオリゴヌクレオチドの濃度の異なる溶液を調製した。次いで、その溶液1 μ Lをガラス基板上にスポット(5 \times 5)した。スポット後、ガラス基板を乾燥した。

【0066】

表2.

溶液濃度 (μ M)	標識されたオリゴヌクレオチド の相対濃度(fmol)
110	110
11	11
1	1
0.5	0.5

【0067】

次に、蛍光スキャナーでその検出限界を調べた。結果を図3に示す。(a)、(b)、(c)、(d)は、それぞれ110fmol、10fmol、1fmol、0.5fmolの結果を示す。

ここで、検出機器には、BIO-RAD モレキュラーイメージャー FX Proを用いた。レーザの波長は488 nm、スキャン間隔は50nmである。

【0068】

(結果)

今回、検出に用いた励起光は488 nmのレーザ光であり、蛍光色素の励起波長は438 nmである。それにも拘わらず、標識されたオリゴヌクレオチドの相対濃度の検出限界は0.5 fmol (500 amol) であり高感度な検出が可能であった。また、DNAとの反応はほぼ定量的であり、反応時間も従来の24時間程度から6時間程度に短縮することが可能であった。さら

に、このEL色素は安定であり、15日間、室温下で保存したEL色素を用いて再測定しても、同等の結果が得られた。

【0069】

実施例2.

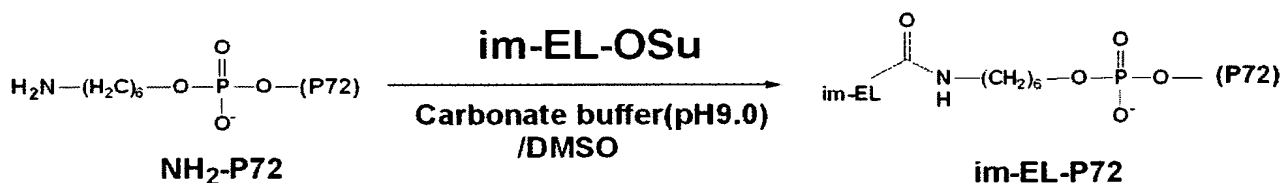
〈オリゴヌクレオチドの色素標識及び検出 (2)〉

【0070】

1. オリゴヌクレオチドの色素標識

オリゴヌクレオチドの色素標識は、以下のスキーム4で行った。標識の条件は実施例1の場合と同様である。イミダゾール誘導体の付加反応は速やかに且つほぼ定量的に進行した。

【化29】



スキーム5.

【0071】

(HPLC測定条件)

カラム: Lichrospher RP-18 (Cica-MERCK) 流速: 1ml/min

検出波長: 260nm 試料注入溶媒: 超純水

溶離液A: 0.1M TEAA buffer (pH7.0), 10% CH₃CN溶液

溶離液B: 0.1M TEAA buffer (pH7.0), 40% CH₃CN溶液

なお、HPLC測定のグラジエント条件は実施例1の場合と同様である。標識されたオリゴヌクレオチドのHPLCスペクトルと目的物のUVスペクトルをそれぞれ図4の(a)と(b)に示す。HPLCの結果、RT=25 min付近に目的物由来のピークが得られたと判断し、HPLC分取を行った。

【0072】

次に、実施例と同様にして蛍光スキャナーでその検出限界を調べた。結果を図5に示す。ここで、(a)、(b)、(c)、(d)、(e)はそれぞれ500 fmol, 250 fmol, 100 fmol, 50 fmol, 10 fmolにおける発光パターンを示す。

【0073】

(結果)

標識されたオリゴヌクレオチドの相対濃度の検出限界は10fmolであり高感度な検出が可能であった。また、オリゴヌクレオチドとEL色素との反応はほぼ定量的であった。

【0074】

実施例3.

〈ペプチド類の標識及び検出〉

1. Ac-Lys(EL)-Lys-Lys-Lys(Acr)-Lys-Lys-Lys(Acr)-Lys-Lys-NH₂の合成

(1) Ac-Lys(Mtt)-(Lys(Boc))₂-Lys(Acr)-(Lys(Boc))₂-Lys(Acr)-(Lys(Boc))₂-Resinの合成

(実験操作)

リアクションベッセルにFmoc-NH-SAL Resin 0.15g(0.61mmol/g)を入れ、カートリッジ3, 6にFmoc-Lys(Acr)-OHを0.26gずつ、カートリッジ1, 2, 4, 5, 7, 8にFmoc-Lys(Boc)-OHを0.18gずつ、カートリッジ9にFmoc-Lys(Mtt)-OHを0.23g入れた。後は、Applied Biosystems社の431A peptide synthesizerを用いて合成を行った。Methodは、standard Fmoc法で行い、N末端はアセチル化した。黄色固体のペプチドレジンが得られ、収量は0.30gであった。

【0075】

(2) Ac-Lys(Mtt)-(Lys(Boc))₂-Lys(Acr)-(Lys(Boc))₂-Lys(Acr)-(Lys(Boc))₂-ResinのMtt基の脱保護、ELの修飾及びレジンの切り出し、及び側鎖の脱保護

(実験操作)

i) Mtt基の脱保護

スクリー管に1で合成したペプチドレジン0.30g入れ、これに過剰のジクロロメタン (DCM) を加えて30分かけて膨潤させた後、過剰のDCMを窒素ガスで除いた。その後、DCM:TF A:TIPS (トリイソプロピルシラン) =94:1:5の混合溶液4mlを加えて2分攪拌し、窒素ガスで溶媒を除いた。この操作を5回繰り返した後、吸引濾過しDCM、トリエチルアミン、DCMで洗浄後、減圧乾燥させた。

【0076】

ii) メトキシ型有機EL色素の修飾

減圧乾燥させたペプチドレジンにNMP 6mlを加えて30分間攪拌して膨潤させ、トリエチルアミン 0.15mlを加えて攪拌した。さらに、活性エステル (6) 0.2gを加えて室温で24時間攪拌した。その後吸引濾過し、NMP、DCMで洗浄して減圧乾燥させた。

【0077】

iii) レジンからの切り出し及び側鎖の脱保護

減圧乾燥させたペプチドレジンにm-クレゾール 0.08ml、チオアニソール 0.48ml、TFA 3.44mlを加えて室温で1時間半攪拌した。その後、吸引濾過しTFAで洗浄した。TFAを減圧除去した後、氷浴中でエーテル15ml加えた。超音波処理後、しばらく放置し、上澄み液を取り除いた。次に、氷浴中で酢酸エチル15mlを加えて、超音波処理後、しばらく放置した。その後、吸引濾過しエーテルで洗浄後、減圧乾燥させた。

【0078】

黄橙色固体が得られ、収量は0.29 gであった。図6に生成物の精製前(a)及び精製後(b)のHPLCスペクトルを示す。R.T.=12.5min付近のピークのサンプルについてTOF-Mass測定を行ったところEL色素とペプチドの複合体 (EL-Peptide) の分子量:2055.30に対応するピークが2057.33に観測され、目的物の生成を確認した。(Matrix: α -CHCA; 図7)

【0079】

2. ペプチドの検出

実施例1と同様の方法により、ガラス基板上にスポットした標識ペプチドの検出を行った。検出機器には、BIO-RAD モレキュラーイメジャー FX Proを用いた。レーザの波長は488 nm、スキャン間隔は50nmである。

【0080】

(結果)

図8は標識されたペプチドの発光パターンであり、(a)、(b)、(c)、(d)、(e)は、それぞれ10fmol、5fmol、1fmol、0.5fmol、0.1fmolの結果を示す。標識されたペプチドの相対濃度の検出限界は0.1 fmol (100 amol) であり高感度な検出が可能であった。また、ペプチドとEL色素との反応はほぼ定量的であった。

【0081】

実施例4.

〈タンパク質の色素標識及び検出〉

1. タンパク質の色素標識

BSAのリジン残基のアミノ基と有機EL色素の活性エステルを反応させてアミド結合を形成させて、BSAの標識化を行った。具体的には、BSA (Bovine Serum Albumin) 4.0 mg(58 nmol)を含む炭酸buffer(pH9.0) 58 μ lに、有機EL色素の活性エステル (EL-OSu) 3.6 mg(8.6 μ mol)を含むDMSO溶液40 μ l加えて37℃で24時間振盪した。その後全量が1 mlになるように0.1 M TEAA buffer(pH7.0)を加え、NAP-10カラム (Pharmacia SephadexG-25)を用いてBSAに由来する成分を分取し、分取した溶液を一晩凍結乾燥した。

【0082】

MALDI TOF MSにより、有機EL色素を標識化したBSAの同定を行った。図9に示すように

、標識化したBSA（図9（b））は原料（図9（a））に比べ、分子量が2200程増加しており、有機EL色素が約5個結合していることがわかった。

【0083】

2. タンパク質の検出

（結果）

調製したBSAは、図10に示すように固体状態で蛍光を発した。このように有機EL色素活性エステルにより、タンパク質を標識化できることが明らかとなった。

【図面の簡単な説明】

【0084】

【図1】本発明の実施例1における、標識されたオリゴヌクレオチドのHPLCスペクトル(a)と目的物のUVスペクトル(b)の一例である。

【図2】本発明の実施例1における、標識されたオリゴヌクレオチドのTOF MSスペクトルの一例である。

【図3】本発明の実施例1における、標識されたオリゴヌクレオチドの発光パターンの一例であり、(a)、(b)、(c)、(d)は、それぞれ110fmol、10fmol、1fmol、0.5fmolの結果を示す。

【図4】本発明の実施例2における、標識されたオリゴヌクレオチドのHPLCスペクトル(a)と目的物のUVスペクトル(b)の一例である。

【図5】本発明の実施例2における、標識されたオリゴヌクレオチドの発光パターンの一例であり、(a)、(b)、(c)、(d)、(e)は、それぞれ500fmol、250fmol、100fmol、50fmol、10fmolの結果を示す。

【図6】本発明の実施例3における、標識されたペプチドの精製前後のHPLCスペクトルの一例であり、(a)は精製前、(b)は精製後のスペクトルである。

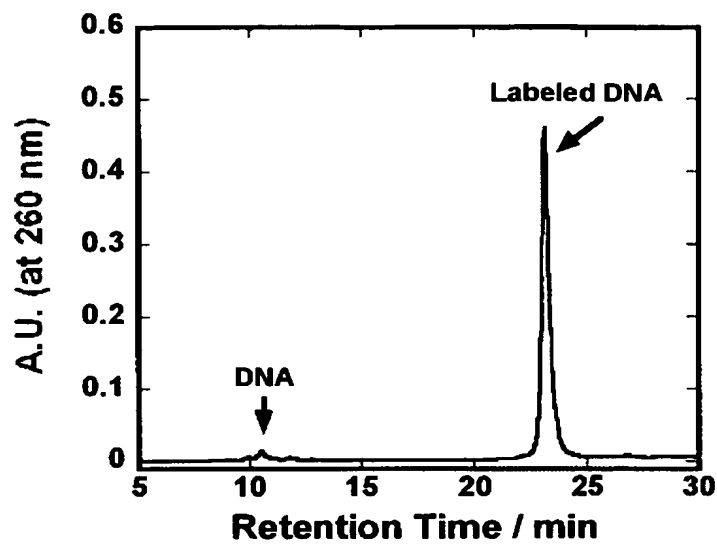
【図7】本発明の実施例3における、標識されたペプチドのTOF MSスペクトルの一例である。

【図8】本発明の実施例3における、標識されたペプチドの発光パターンの一列であり、(a)、(b)、(c)、(d)、(e)は、それぞれ10fmol、5fmol、1fmol、0.5fmol、0.1fmolの結果を示す。

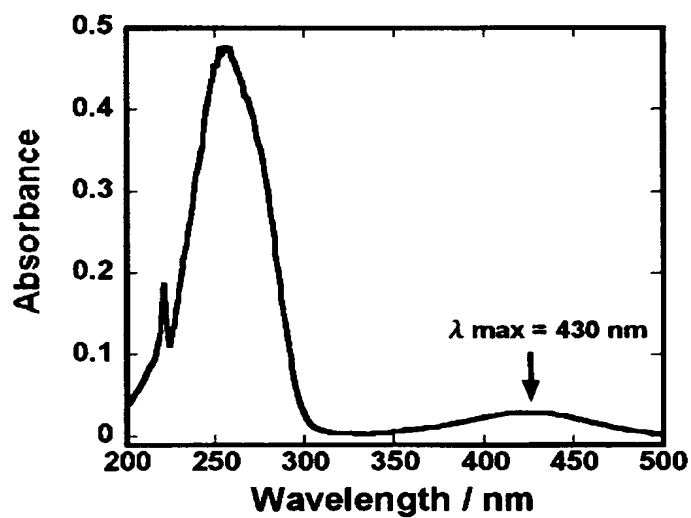
【図9】本発明の実施例4における、標識されたタンパク質のTOF MSスペクトルの一例であり、(a)は標識前、そして(b)は標識後のスペクトルである。

【図10】本発明の実施例4における、標識されたタンパク質の発光パターンの一列である。

【書類名】図面
【図1】



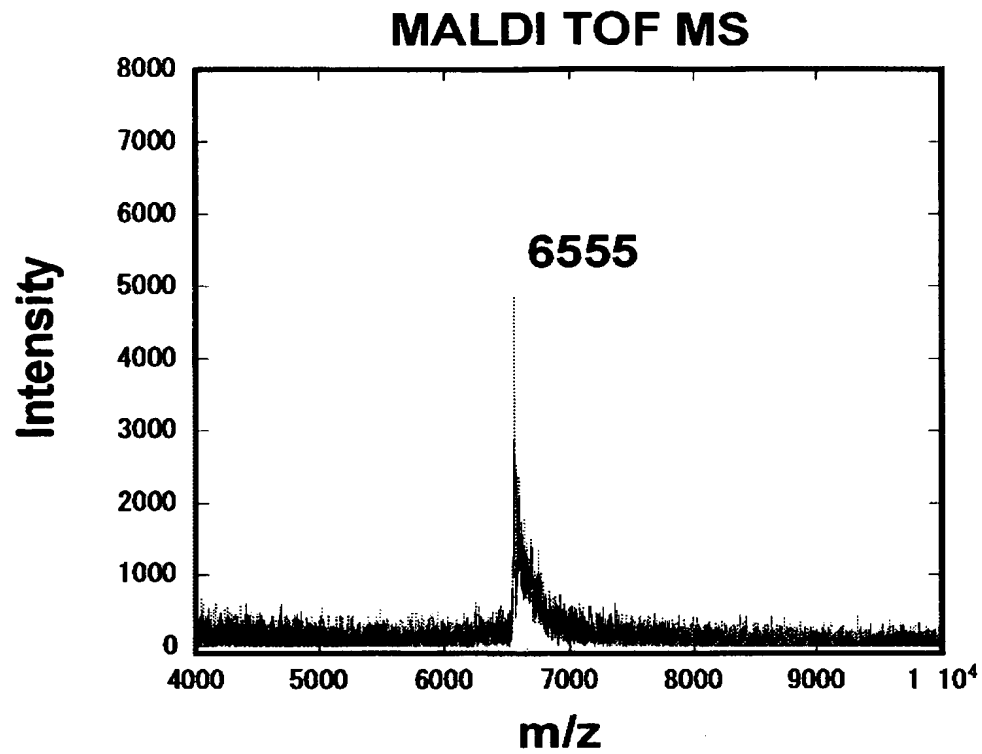
(a)



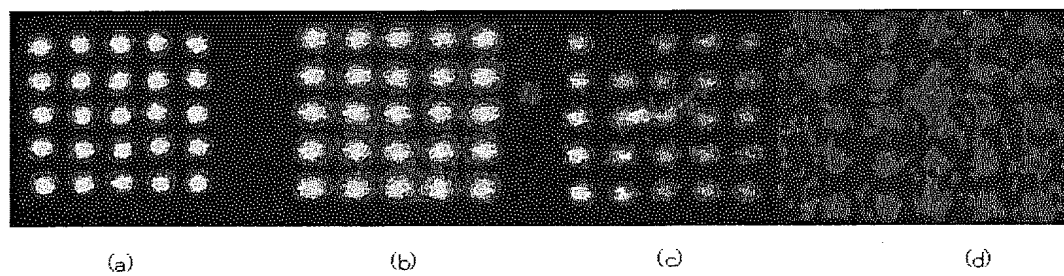
(b)

【図 2】

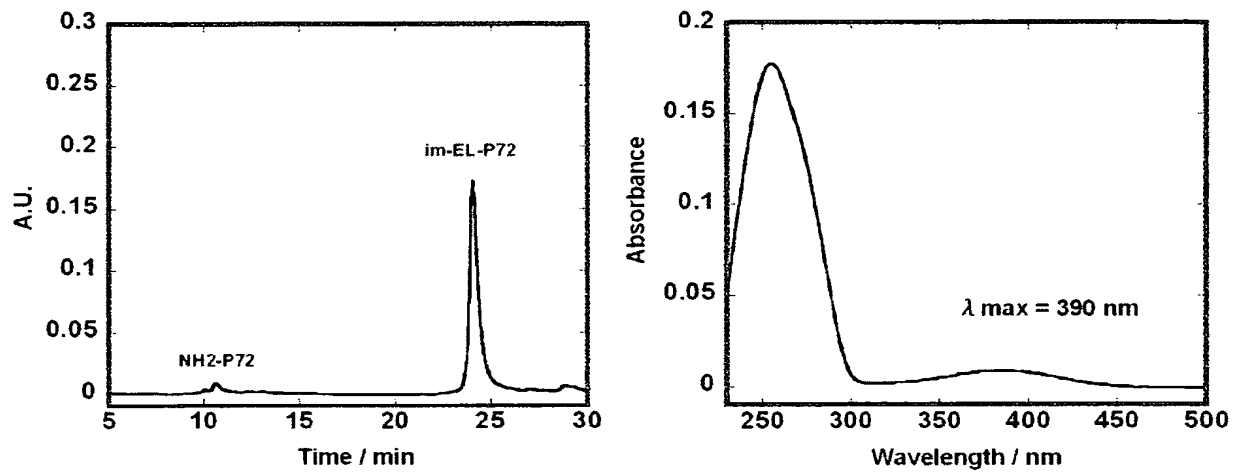
$m/z = 6565$ Matix : 3-HPA



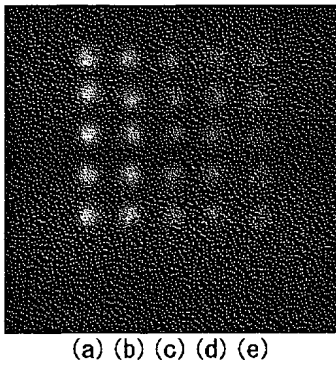
【図 3】



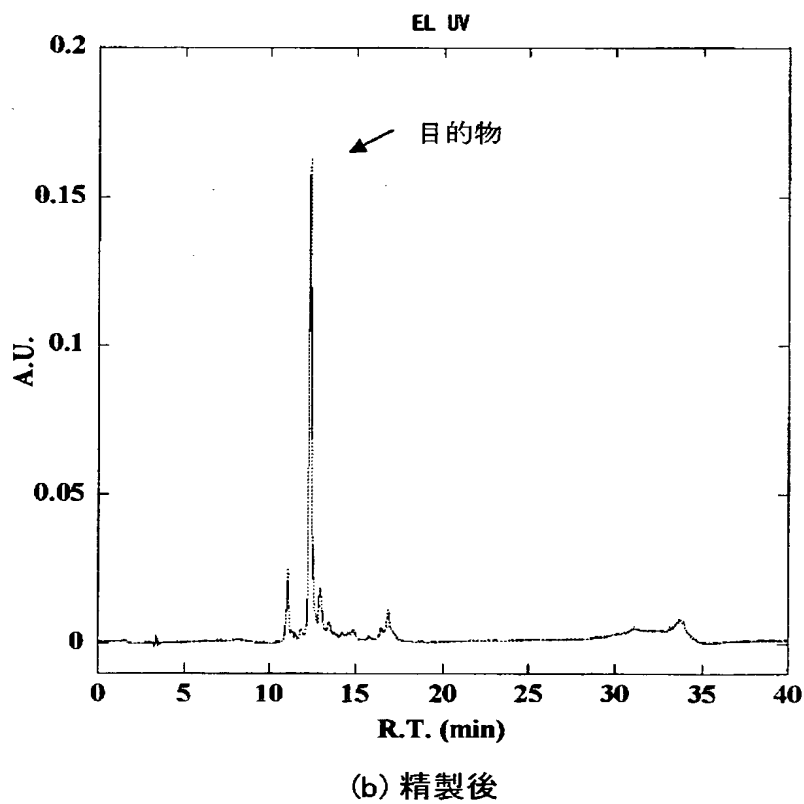
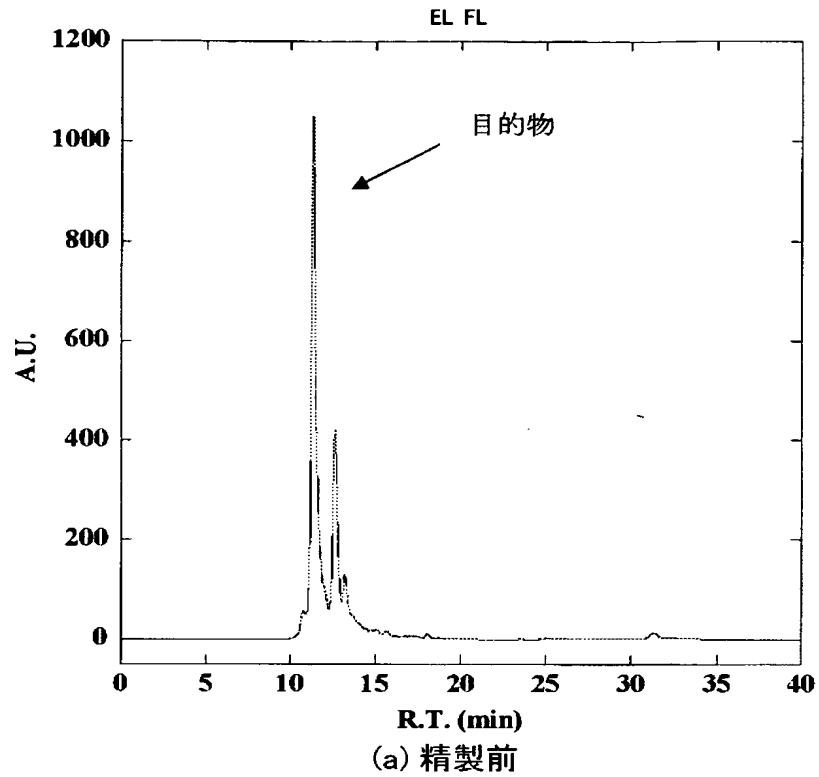
【図 4】



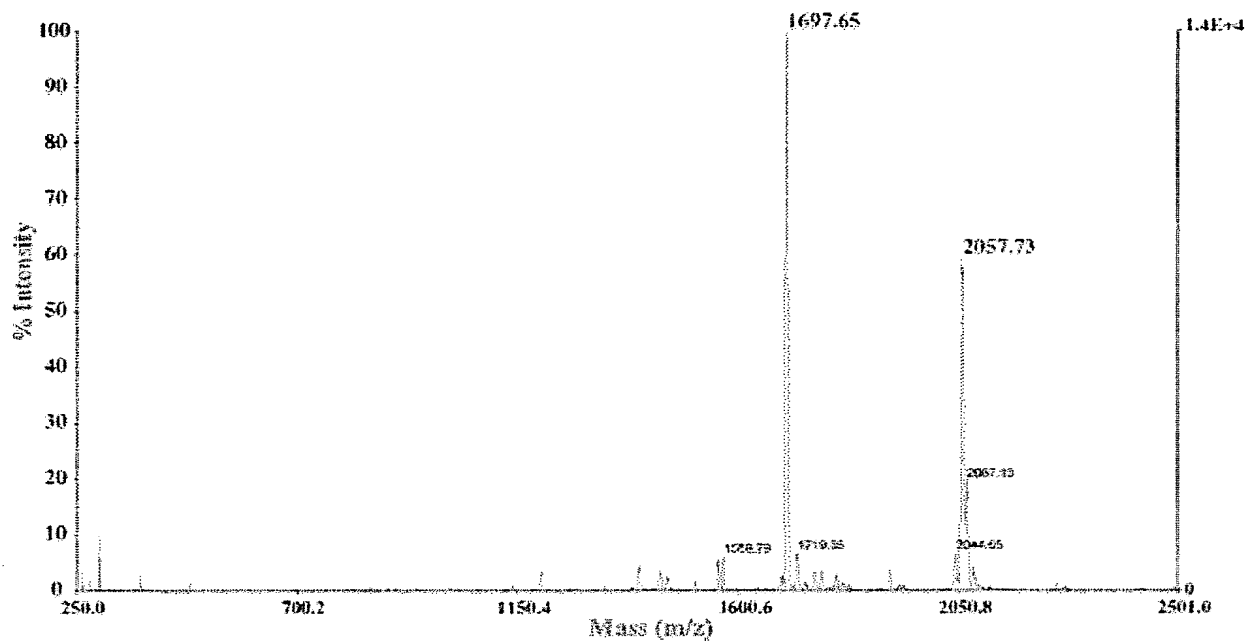
【図 5】



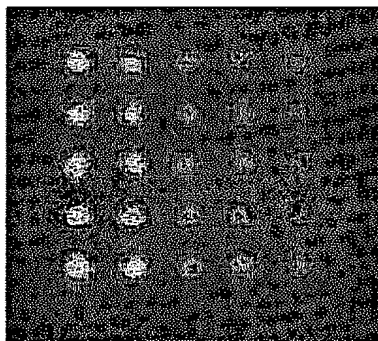
【図 6】



【図 7】

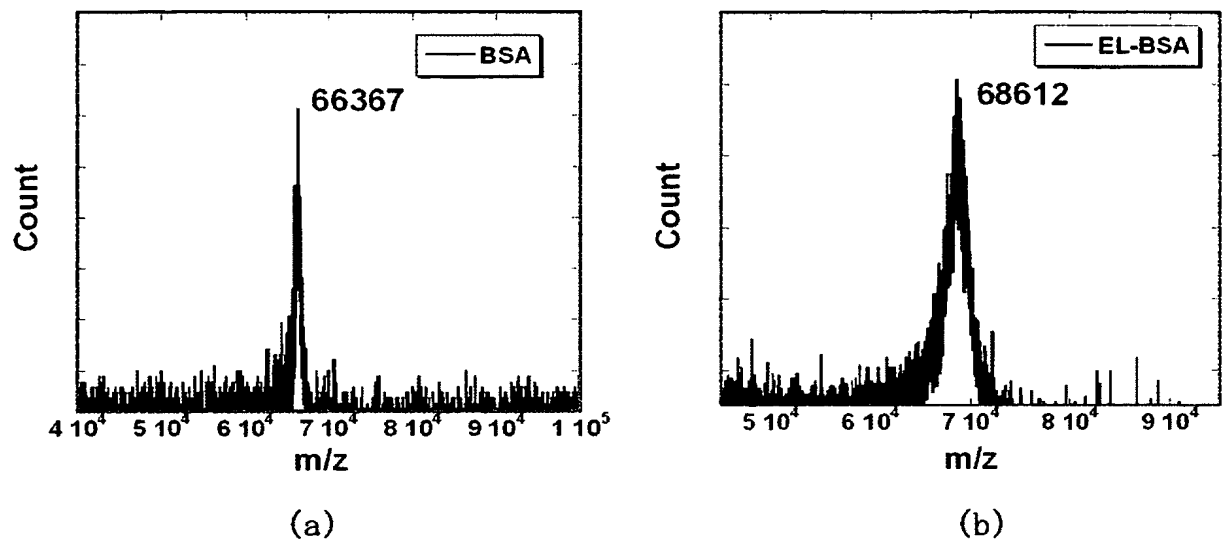


【図 8】



(a) (b) (c) (d) (e)

【図 9】



【図 10】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 より低コストで、高感度の生体高分子の検出方法を提供すること。

【解決手段】 生体高分子試料と有機EL色素とを反応させ、有機EL色素で標識された該生体高分子試料の蛍光を測定する。標識色素に有機EL色素を用いることにより、より低コスト、かつ高感度に生体高分子を検出することができる。

【選択図】 なし

特願 2 0 0 4 - 1 0 5 1 8 7

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [5 0 3 4 7 4 0 9 8]

1. 変更年月日 2 0 0 3 年 1 2 月 2 4 日

[変更理由] 新規登録

住 所 福岡県福岡市南区屋形原 1 丁目 1 9 - 2 8 - 1 2

氏 名 磯部 信一郎

特願 2 0 0 4 - 1 0 5 1 8 7

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [5 0 1 4 1 5 5 5 6]

1. 変更年月日	2 0 0 1 年 1 0 月 2 5 日
[変更理由]	新規登録
住 所	福岡県大野城市大池 2 丁目 1 7 番 5 号
氏 名	又 賀 駿 太 郎

特願 2 0 0 4 - 1 0 5 1 8 7

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [3 9 9 0 4 5 9 5 0]

1. 変更年月日 2 0 0 1 年 5 月 1 6 日
[変更理由] 識別番号の二重登録による抹消
[統合先識別番号] 5 9 6 0 5 7 0 1 1
住 所 福岡県古賀市舞の里 4 - 2 3 - 2 1
氏 名 竹中 繁織

特願 2 0 0 4 - 1 0 5 1 8 7

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [5 9 6 0 5 7 0 1 1]

1. 変更年月日 2 0 0 1 年 5 月 1 6 日
[変更理由] 識別番号の二重登録による統合
[統合元識別番号] 3 9 9 0 4 5 9 5 0
住 所 福岡県古賀市舞の里 4 - 2 3 - 2 1
氏 名 竹中 繁織